

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

E.A.P DE TECNOLOGIA MÉDICA

**Serotipificación de Escherichia coli enteropatógena
(EPEC) en cuadros diarreicos agudos de niños
menores de cinco años:**

Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé,
noviembre 2000-marzo 2001

TESIS

para optar el título profesional de Licenciado en Tecnología Médica

AUTOR

Ruth Ysabel Alarcón Bendezú

Jessica Giovanna Li Huasasquiche

ASESORES

John Victorio Contreras

Javier Orlando Soto Pastrana

Lima – Perú

2007

**“SEROTIPIFICACIÓN DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA (EPEC)
EN CUADROS DIARREICOS AGUDOS DE NIÑOS MENORES DE CINCO
AÑOS”.**

HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE-NIÑO “SAN BARTOLOME”

NOVIEMBRE 2000 – MARZO 2001

DEDICATORIA:

A Dios por permitirme culminar este trabajo y fortalecerme día a día, en su infinita misericordia y amor que me regala.

A mis padres por ser los pilares de mi formación personal y su confianza ; a mi querido esposo Ivan por ser el apoyo incondicional, por tenerme paciencia y confianza en que voy a lograr mis objetivos; a mis tres adorados hijos Gonzalo, Josué y Gian que son la razón de mi existir y por quienes lucho día a día. ¡GRACIAS AMADO JESUS POR LOS DONES DADOS!

JESSICA

A mis padres y hermanos por el amor, la confianza y la generosidad brindada a lo largo de toda mi vida.

RUTH

AGRADECIMIENTO:

*A nuestros asesores: **Lic. T. M. Javier Orlando Soto Pastrana.**, responsable del área de microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” y **Lic. T.M. John Victorio Contreras**, docente de Tecnología Médica UNMSM, por su orientación y sugerencias a la elaboración del presente estudio. Así mismo al personal del departamento de microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé: **Dr. Augusto Valencia**, **Lic. Juan Carlos Riveros**, **Alfonso Terán**, por las facilidades prestadas para la ejecución del trabajo. De manera muy especial al **Lic. T. M. Jaime Heli Barrón Pastor** del Hospital Nacional “San José” – Callao docente contratado del Departamento de Bioquímica UNMSM y al **Dr. Gerardo Zapata Chero**. Asistente del Departamento de Cirugía Pediátrica del Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”, por su paciencia y apoyo incondicionalmente brindado en la culminación de la investigación.*

ÍNDICE

RESUMEN.....	Pág.6
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Epidemiología de los cuadros diarreicos.	Pág. 7
1.2 <i>Escherichia coli</i> diarreogenica	Pág. 7
1.2.1 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Pág. 9
1.2.2 <i>E. coli</i> enteroinvasora (ECEI)	Pág. 9
1.2.3 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	Pág. 9
1.2.4 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Pág. 10
1.2.5 <i>E. coli</i> enteroadherente (ECEA)	Pág. 10
1.2.6 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EagEc)	Pág. 10
II. <i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENA	Pág. 10
2.1 Generalidades.	Pág. 10
2.2 Epidemiología de diarreas por EPEC.....	Pág. 12
2.3 Cultivo y aislamiento de EPEC.....	Pág. 13
2.3.1 Características bioquímicas de los cultivos.....	Pág. 13
2.4 Manifestaciones clínicas.....	Pág. 14
2.5 Patogenia – Fisiopatología.....	Pág. 14
2.5.1 Adherencia y destrucción.....	Pág. 15

2.5.1.1 Adherencia inicial	Pág. 15
2.5.1.2 Transducción de señales	Pág. 16
2.5.1.3 Anclaje íntimo	Pág. 16
2.5.2 Otros factores de virulencia	Pág. 16
2.5.2.1 Toxinas.....	Pág. 16
2.6 Métodos de diagnóstico de las diarreas producidas por EPEC	Pág. 17
2.6.1 Serotipificación	Pág. 17
2.6.2 Ensayo de adherencia en células Hep-2	Pág. 19
2.6.3 Prueba de tinción fluorescente para actina (FAS).....	Pág. 19
2.6.4 Técnicas de biología molecular	Pág. 21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 22
IV. RESULTADOS.....	Pág. 27
V. DISCUSIÓN	Pág. 38
VI. CONCLUSIONES	Pág. 43
VII. RECOMENDACIONES.....	Pág. 44
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	Pág. 45
IX. ANEXOS	Pág. 53

RESUMEN

Con el objetivo de determinar los serotipos más frecuente de *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) en los cuadros diarreicos agudos de niños menores de cinco años, se diseñó una investigación de tipo **descriptivo, transversal, y observacional** . La población de estudio estuvo constituida por 251 niños tratados en forma ambulatoria en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” durante los meses de noviembre del 2000 a marzo del 2001. Se encontró 42 % (105 casos) de coprocultivos positivos a bacterias enteropatógenas, siendo *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) con 29,2 % (35 casos), la segunda causa más frecuente después de *Shigella* sp. Los serotipos de EPEC encontrados fueron: 9 casos del O119, 8 casos de O26, 6 casos del O55 y 2 casos del O86. Se concluye que lo serotipos más frecuentes de EPEC en los cuadros diarreicos agudos de niños menores de cinco años fueron el O119 y el O26.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de los cuadros diarreicos.

Los cuadros diarreicos constituyen un gran problema de morbilidad-mortalidad en niños menores de cinco años, además, episodios diarreicos durante el primer año de crecimiento infantil pueden deteriorar el estado nutricional y generar graves secuelas. Se observa mayor frecuencia en países en desarrollo; donde las características socioeconómicas condicionan la aparición de enfermedades diarreicas agudas: dependiente del bajo nivel educativo, malos hábitos de higiene personal, carencia del saneamiento ambiental, disponibilidad insuficiente de agua potable, bajos ingresos per cápita, mala disposición de excretas, estado de mala nutrición y la inadecuada atención médica primaria (1, 2, 3).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que cada año, en los países en desarrollo, se presentan 1 300 millones de episodios de diarrea en menores de cinco años, los cuales ocasionan 4 millones de decesos; en el Perú durante el año 1990 se registraron 13 500 muertes, esto indica que las diarreas son unas de las principales causas de deceso en nuestro país (4, 5, 6, 7).

1.2 *Escherichia coli* diarreogenicas:

Escherichia coli (*E. coli*) fue aislada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich y los primeros reportes sobre la capacidad de cepas de *Escherichia coli* para causar diarrea severa en niños, aparecieron en la literatura médica a mediados del año 1940 como resultado de un llamativo brote

epidemiológico de gastroenteritis infantil aguda (8, 9).

Escherichia coli es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de la cual se engloban, entre otros, los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Arizona*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia*, *Morganella*, *Serratia* y *Hafnia*.

E. coli es una bacteria gramnegativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, siendo la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales. Se excreta diariamente con las heces (entre 10^8 - 10^9 UFC/g de heces) y, por sus características, es uno de los indicadores de contaminación fecal reciente más utilizados (5).

Junto con el resto de bacterias presentes en el intestino realiza diferentes funciones fisiológicas beneficiosas para el huésped como, por ejemplo, la síntesis de factores nutritivos esenciales o el procesamiento de los residuos alimentarios (8, 10).

Escherichia coli diarreogénica, ocupa una posición única entre los bacilos entéricos oportunistas ya que ciertas cepas son capaces de causar enfermedad intestinal primaria así como infección extraintestinal. Además *E. coli* ha sido objeto de más investigaciones experimentales que ningún otro microorganismo, especialmente en el campo de la Biología Molecular (11, 12, 13).

Debido a que *E. coli* es parte de la flora fecal normal, la única forma de definir las *E. coli* diarreógenas es demostrando sus características de virulencia y varían de manera considerable de acuerdo a su patogénesis (10, 11). El mecanismo por el cual algunos *E. coli* produce diarrea implica, en los casos típicos, la adherencia de los gérmenes a un receptor de glucoproteína o glucolípido, seguida de la producción de fimbria BFP (“Bundle Forming Pilus”), sustancia nociva que daña las células intestinales o altera la función del intestino (14, 15, 16). Se identifican seis clases de *Escherichia coli*

como agentes asociados a la gastroenteritis en pediatría. Aquí se resume la clasificación actual que se modifica a medida que se clonan y se determina la secuencia de nuevos genes de virulencia (17, 18) y son:

1.2.1 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Las ETEC aparecen como uno de los agentes asociados con mayor frecuencia a la diarrea aguda, colonizan la mucosa del intestino delgado mediante pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (localization factor antigens) (19, 20). El principal mecanismo de patogenicidad es la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas **LT** (toxina termolábil) y **ST** (toxina termoestable) que desencadenan el sistema adenilciclase y aumentan la secreción de agua y electrolitos, sin producir lesión ni destrucción celular.

La toxina termolábil es la que aumenta el nivel intracelular de cAMP y la toxina termoestable, incrementan la cGMP que se encuentran en la membrana de las células intestinales (21, 22, 23, 24).

1.2.2 *E. coli* enteroinvasora (EIEC)

El mecanismo de patogenicidad codificado genéticamente por ADN cromosómico y por plásmidos, consiste en la invasión del epitelio del colon. El primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, siguiendo la multiplicación y diseminación a células sanas adyacentes causando muerte celular y una respuesta inflamatoria rápida (20, 25).

1.2.3 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

La adherencia al intestino delgado y grueso es su principal factor de patogenicidad,

este proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de la célula epitelial intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del cito-esqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, ha sido denominada adherencia y esfacelamiento (A/E) (19, 20).

1.2.4 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

El principal mecanismo de patogenicidad de las cepas EHEC es la producción de la toxina **STX** (toxina shiga) que también produce el fenómeno de A/E ocasionando lesión de unión estrecha. EHEC produce 2 tipos principales de toxinas: la verotoxina 1 (VT-1) y la verotoxina 2 (VT-2) las cuales causan inhibición de la síntesis proteica y muerte celular (18, 19).

1.2.5 *E. coli* enteroadherente (ECEA)

Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie conocida como F1845 involucrada en el fenómeno de adherencia difusa (8, 18).

1.2.6 *E. coli* enteroagregativa (EagEc)

En el mecanismo de patogenicidad de EagEc están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce. Se sabe que las cepas EagEc tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EagEc para colonizar persistentemente el epitelio del colon y causar diarrea (20, 26).

II. *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA (EPEC)

2.1 Generalidades

Las cepas EPEC infectan poblaciones humanas en todo el mundo y permanecen como una de las causas primarias de diarrea infantil en países en desarrollo (10, 27, 28); estos agentes etiológicos asociados a enfermedades diarreicas a nivel mundial han mostrado que la importancia relativa de patógenos entéricos varía ampliamente por estación, residencia urbana o rural, clase socioeconómica y localización geográfica y particularmente con la edad del huésped (29, 30).

Bray en Inglaterra (10, 31); Varela, Aguirre y Carrillo en México (32), describieron en forma totalmente independiente, la presencia de cepas de *Escherichia coli* como germen único, en coprocultivos obtenidos en niños pequeños en ambos países con diarrea severa. Neter (32), propuso el término de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) para designar este grupo de bacterias aisladas de niños con diarrea capaces de reproducir el cuadro clínico cuando se administran a humanos adultos (33).

Los niños alimentados con leche materna son generalmente más resistentes a la infección por EPEC (27). Estudios realizados sugieren el empleo de calostro de vacas inmunizadas contra EPEC para el tratamiento de infecciones por esta variante. Los serotipos relacionados a EPEC, observados con frecuencia en diarrea infantil en nuestro medio son el O119 y O111 (34, 35, 36).

La *E. coli* enteropatógena fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes y se le considera un agente etiológico de diarreas agudas en niños menores de cinco años.

La *E. coli* (EPEC) es un bacilo gramnegativo, catalasa positiva y oxidasa negativa, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. *E. coli* es el bacilo anaerobio facultativo predominante en el intestino del hombre y otros mamíferos. Igual que otros

microorganismos gramnegativos, la pared celular lipopolisacárida contiene lípido A y 2-ceto-3-desoxioctanato (CDO), un glucolípido de núcleo que se ha utilizado en el desarrollo de una vacuna para protección cruzada contra infecciones sistémicas para otros gramnegativos (18, 37, 38). La tipificación serológica de los antígenos O, K, y H de *E. coli* proporciona una útil herramienta epidemiológica. Actualmente se han descrito por lo menos 150 antígenos **O**, 90 antígenos **K** y 50 antígenos **H**. Los antígenos K se dividen en tres tipos principales **L**, **A** y **B**. El tipo serológico de un *E. coli* se da en forma: tipo O, tipo K, tipo H, ejemplo: *E. coli* 111:58:2 (38).

Las formas lisas (L) de *E. coli* tienen cadenas específicas “O” de carbohidratos unidas a su glucolípido central para proporcionar 169 serogrupos “O” y cuando menos 60 antígenos flagelares (H) proteínicos termolábiles, sin mencionar los numerosos factores identificados de adherencia, enterotoxina, citotoxina e invasividad que puede adquirir o perder un serotipo particular, ya que son codificados de manera característica en elementos genéticos transmisibles, como plásmidos o bacteriófagos (39). En consecuencia este huésped común del intestino normal del hombre se constituye en un patógeno cuando aloja uno o más caracteres específicos que contribuyen a la formación de colonias y virulencia en el intestino.

2.2. Epidemiología de las diarreas por EPEC

Escherichia coli EPEC son productoras de diarrea que causan frecuentes infecciones en los primeros años de vida con mayor incidencia en el Perú y el mundo, es transmitida por vía fecal oral y el vehículo más frecuente de infección es la ingestión de alimentos contaminados (12, 38). Su frecuencia es mayor durante los meses cálidos en las zonas templadas y durante los meses lluviosos en los climas tropicales (13).

La infección es más probable en lugares donde las prácticas de manipulación de alimentos y de eliminación de residuos no son óptimas. Aunque la infección se observa también en niños en Estados Unidos, se ve con más frecuencia entre los que viven o han visitado recientemente países en vías de desarrollo. Las EPEC se transmiten de persona a persona y a través de los alimentos, lo que sugiere que basta un inóculo menor de estos gérmenes para producir la enfermedad (10, 12, 13).

En el Perú *Escherichia coli* EPEC ocupa el segundo lugar como bacteria patógena productora de diarrea aguda en niños menores de cinco años (40).

2.3 Cultivo y aislamiento de EPEC

Generalmente la bacteria se aísla de muestras de heces en medio selectivos para enterobacterias como el agar Mac Conkey o en agar eosina azul de metileno, los cuales permiten la identificación de *E. coli* en base a su morfología. Hay que tener en cuenta que el hallazgo de *E. coli* en muestra fecales de niño con diarreas no es significativo a menos que se demuestre que la bacteria aislada tenga factores de virulencia que la vinculen con la enfermedad y para ellos se requieren de pruebas adicionales a las de rutina. El análisis microbiológico, en términos de la relación costo-beneficio, cobra valor en cuadros diarreicos, como herramienta útil para direccionar medidas de prevención de la diseminación de estos agentes al identificar fuentes ocultas en niños asintomáticos, que podrían representar riesgo potencial para las poblaciones (41).

2.3.1 Características bioquímicas de los cultivo

E. coli es la especie tipo del género *Escherichia* crece bien en muchos medios comúnmente utilizados en el cultivo de heces, algunas cepas producen beta

hemólisis en agar sangre. Incluye gérmenes generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Son inhibidos por KCN e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Son H₂S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y decarboxilan la lisina. (13, 18, 37, 38).

2.4 Manifestaciones clínicas

Los pacientes afectados de diarrea infecciosa aguda debutan de forma característica con náuseas, vómito, dolor abdominal que es leve, difuso y cólico debido al elevado volumen de líquido secretado que estimula el peristaltismo y ocasiona diarrea acuosa, fiebre (10, 31). Como cabe esperar por los diferentes mecanismos patogénicos, las características clínicas de la diarrea asociada a *E. coli* varían de un grupo a otro. Las EPEC se aíslan en lactantes y niños en los primeros años de vida que tienen una diarrea no sanguinolenta con moco, puede haber fiebre (1). A diferencia de los otros grupos de *E. coli* las EPEC causan con frecuencia una diarrea prolongada (18).

2.5 Patogenia – fisiopatología

Unos de los principales **factores de virulencia** de estas cepas lo constituyen una alteración histopatológica que la bacteria produce a nivel de las microvellosidades intestinales conocida como A/E (adherencia y esfacelamiento) .Es un sistema de adherencia al epitelio intestinal, a través de una proteína de membrana externa conocida como **intimina**, codificada genéticamente. Este gen no es exclusivo de las

EPEC, sino que ya había sido descrito anteriormente en otras especies que causan lesiones del tipo A/E y son responsables de diferentes tipos de diarrea como la causada por las cepas EHEC (42).

En 1979 Cravioto y cols, señalaron la capacidad de EPEC para adherirse en forma íntima a células eucariotes en cultivo. Dichos autores encontraron que el 80% de una colección de cepas EPEC formaban microcolonias sobre el citoplasma de células Hep-2, característica que no era compartida con otros grupos de *E. coli* asociados a la producción de diarrea (31).

2.5.1 Adherencia / Destrucción

El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de células del epitelio intestinal, seguido de la destrucción de las microvellosidades, con alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, ha sido denominado de muchas maneras adherencia/esfacelamiento o adherencia – barrido (Attaching-Effacing) (32). Este mecanismo de patogenicidad se divide en tres fases:

2.5.1.1 Adherencia inicial

Mediada por moléculas de tipo fimbrial conocido como **pilis BFP** (Pili formador de penachos), permiten que las bacterias interaccionen de manera tridimensional promoviendo la adherencia inicial sobre la superficie celular, la pérdida de las microvellosidades y la formación de imágenes en pedestal (43, 44, 45, 46). Giron y cols (33) encontraron que una cepa EPEC que fue crecida repetidas veces en agar sangre, expresaba hatos de fimbrias semejante a los de *Vibrio cholerae* y *Neisseria gonorrhoeae*. La codificación genética para la producción de fimbrias está controlada en el operón **bfp**, estos genes están presentes en un **plásmido EAF** (factor de

adherencia EPEC) relacionado con la capacidad de cepas EPEC para adherirse de forma localizada como para causar diarrea en voluntarios humanos. Por otro lado, la fase íntima de adherencia, anterior a la destrucción de las microvellosidades intestinales, se relaciona con la expresión de una proteína de membrana externa de 94 KDa conocida como **intimina**, codificada por el gen *eaeA*, localizado en una región del cromosoma conocida como **LEE** (*locus of enterocyte effacement*) (28, 47).

2.5.1.2 Transducción de señales

Los efectos inmediatos que se inducen durante la transducción de señales durante la patogénesis de EPEC incluyen cambios a nivel intracelular que repercuten con la actividad fisiológica normal de la célula intestinal, tal es el caso del aumento en la secreción de electrolitos al espacio extracelular y remodelación de la región apical del enterocito, el proceso de adherencia íntima da lugar a la acumulación de **actina** polimerizada, talina, y ezrina en la célula epitelial, lo cual es reflejo de cambios intracelulares importantes en el citoesqueleto celular (28).

2.5.1.3 Anclaje íntimo

Paralelo a la transducción de señales, la bacteria se adhiere estrechamente a la célula mediante la participación coordinada de la proteína **intimina** (94 KDa) y su receptor en la célula llamada **Tir** que la bacteria secreta y envía hacia la membrana del enterocito. Esta interacción íntima con Tir es esencial para la formación del pedestal y la lesión intestinal.

2.5.2 Otros factores de virulencia

2.5.2.1 Toxinas:

Recientemente se ha descrito una proteína involucrada en la enterotoxigenicidad provocada por EPEC llamada EspC (Proteína C Secretada por EPEC); EspC pertenece a la familia de proteínas transportadores e interviene en el incremento en la corriente de corto circuito y diferencia de potencial, que involucra la salida masiva de iones hacia el espacio extracelular y correlaciona con la diarrea acuosa que se observa.

Investigaciones posteriores, incluyendo estudios con microscopía electrónica, revelaron que las cepas EPEC se encontraban adheridas a la membrana del enterocito de manera íntima con destrucción histopatológica importante de las vellosidades intestinales (31).

2.6 Métodos de Diagnóstico de las diarreas producidas por EPEC

Las características clínicas de la enfermedad rara vez son lo suficientemente específica como para permitir un diagnóstico fiable y los estudios habituales de laboratorio tienen un valor muy limitado. El diagnóstico en la actualidad depende en gran medida de estudios de laboratorio que no son fácilmente accesibles al médico (22). Actualmente, las enfermedades diarreicas agudas se investigan molecularmente, sin embargo, las técnicas convencionales continúan siendo herramientas insustituibles (47). Para la identificación de EPEC se han utilizados diversos esquemas, entre los que se incluyen la serotipificación, el ensayo de adherencia en células Hep-2, la prueba de FAS y técnicas de biología molecular (42).

2.6.1 Serotipificación

El aislamiento de la bacteria, se realiza a partir de materia fecal o hisopo rectal, la misma que se siembra con la punta del hisopo en la parte superior de una placa de

agar Mac Conkey u otro medio selectivo y, con una asa redonda de nicrom, se continua el aislamiento, sembrando por estría cruzada; después se incuba a 37°C durante 18 a 24 horas. Posteriormente se seleccionan de 5 a 10 colonias típicas de *E. coli* lactosas positivas para la identificación bioquímica y posterior serotipificación (6, 18).

Los cultivos de heces habituales en donde se aíslan *E. coli* son interpretados algunas veces como “flora normal”. El cultivo de jugo duodenal puede ser útil para detectar EPEC, por su tendencia a colonizar el intestino delgado (27).

Algunos de estos gérmenes, especialmente las EPEC, podrían ser teóricamente identificados serológicamente, sin embargo, la frecuencia de reacciones cruzadas, la falta de reactivos adecuados y lo poco frecuente de que la determinación del serogrupo baste por sí sólo para definir un patógeno, hacen que estos métodos sean inadecuados.

La serotipificación permite diferenciar a los serotipos de EPEC involucrados históricamente en la diarrea o como los han referidos algunos autores, “serotipos clásicos”. En un estudio realizado en Italia (48) en el cual se utilizó a cepas aisladas de cuadros de gastroenteritis de niños y diagnosticados mediante un Kit comercial de serotipificación, se logro corroborar mediante pruebas de virulencia que el 75 % de los serotipos clásicos presentaron uno o mas factores de patogenicidad asociados a EPEC, similares resultados han sido reportados en otras regiones geográficas (42). A pesar de la marcada correlación de la serotipificación con los factores de virulencia asociados a EPEC, la serotipificación no es una técnica ampliamente utilizada en nuestro medio debido a los costos y disponibilidad de los antisueros y queda solamente limitada a los laboratorios de referencia como el Instituto Nacional de Salud (INS) en el Perú.

Hay que tener en cuenta que el hallazgo de *E. coli* en muestras fecales de niños con diarrea no es significativo a menos que se demuestre que la bacteria aislada tenga factores de virulencia que la vinculen con la enfermedad y para ello se requieren de pruebas adicionales a las de rutina (19).

En nuestro país los laboratorios y hospitales que cuentan con antisuero polivalente A, B y C de EPEC realizan la prueba de aglutinación en cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea con moco y sangre, especialmente menores de un año (49). No obstante la determinación de los serotipos esta limitado a los laboratorios de referencia (8, 10).

Para el diagnóstico definitivo es necesario comprobar su carácter de virulencia para ello se deben transportar los microorganismos sospechosos a laboratorios de referencia o de investigación (38). Rara vez son necesarios estos esfuerzos, pero pueden ser cruciales para un diagnóstico correcto de niños con complicaciones graves o de riesgo vital o en la investigación ocasional de un brote (8, 10).

Los “serotipos clásicos” que se utilizan en algunos laboratorios de referencia o de investigación son: O111, O55, O26, O86, O119, O127, O125, O126, O128, O114, O124, O142. Otros serotipos de EPEC que estan implicados en diarreas se observan en el **cuadro N° 1**(Ver anexos).

2.6.2 Ensayo de adherencia en células Hep-2

Este ensayo, descrito por Cravioto et. al. (1979), es una determinación fenotípica considerada como el estándar de oro para el diagnóstico de EPEC; permite identificar a la bacteria gracias a que se dispone en cúmulos sobre las células epiteliales en cultivo, esta forma de adherirse a la célula se conoce como patrón de adherencia localizada (LA) (49).

2.6.3 Prueba de tinción fluorescente para actina (FAS)

Es una técnica alternativa que ha sido ampliamente usada para la identificación de EPEC en estudios epidemiológicos e investigación básica. Mediante el ensayo de FAS se puede observar la acumulación de actina en zonas por debajo de las bacterias adheridas a las células (rearreglo del citoesquelético) utilizando para ello un microscopio de fluorescencia. En la técnica se utiliza un compuesto fluorescente (faloidina rodaminada) el cual se une constitutivamente a la actina por lo que se puede observar el desarreglo del citoesqueleto de actina. La prueba se puede realizar directamente en biopsias intestinales de niños con enfermedad diarreica en donde se sospecha infección por EPEC. Por otro lado, la acumulación intracelular de actina, se puede reproducir in vitro utilizando la cepa aislada poniendo en contacto con cultivo de células eucarióticas el Hep-2 durante 4 horas en presencia de D-manosa subsecuentemente las células se fijan y se tiñen mediante FAS (42).

2.6.4 Técnicas de biología molecular

Dentro de los estudios moleculares que se han diseñado para el diagnóstico de EPEC se encuentran las sondas de ácidos nucleicos (secuencias específicas de DNA) que reconocen o capturan el DNA de EPEC en muestras clínicas, comúnmente se utilizan sondas sintetizadas a partir de la secuencia genética del plásmido de virulencia EAF (eaf), del Pili BFP (bfpA) o del gen de la intimina (eae) (18, 36).

También se cuenta con una serie de iniciadores (primer) reportados en la literatura que permiten amplificar por la reacción en cadena polimerasa (PCR) secuencias específicas de genes que se han localizado típicamente en las cepas de EPEC como lo son los genes de la intimina (eae), plásmido (eaf) y el Pili BFP (bfpA).

Para una evaluación definitiva se deben transportar los microorganismos sospechosos a laboratorios de referencia o de investigación. Rara vez son necesarios estos esfuerzos, pero pueden ser cruciales para un diagnóstico correcto de niños con complicaciones graves o de riesgo vital o en la investigación ocasional de un brote (12).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio ejecutado fue de tipo **Descriptivo, transversal y observacional** ; realizado en el “Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” en el Departamento de Microbiología donde se procesaron 251 muestras de heces en niños menores de cinco años con cuadros diarreicos agudos tratados en forma ambulatoria durante los meses de noviembre del 2000 a marzo del 2001.

Se utilizaron fichas clínico - epidemiológicas para la obtención de datos de los pacientes, los cuales fueron llenadas previo consentimiento de los padres de familia. Posteriormente se le informo sobre los resultados obtenidos.

También se utilizo una ficha microbiológica para el llenado de los resultados del estudio.

Criterios de inclusión:

- a) Niños menores de cinco años que presentaron diarrea aguda
- b) Diarrea de consistencia líquida o semisólida mayor de tres veces al día ,en 24 horas por 1 – 7 días.

Criterios de exclusión:

- a) Niños con tratamiento
- b) Niños mayores de cinco años.

Se evaluaron a los niños a través de una Ficha clínico – epidemiológica (ver en anexos).

- a. Uso de la ficha microbiológica.
- b. Sistema estadístico computarizado Epi – Info.

Procedimiento:

Se solicitaron muestras de heces para el examen macroscópico y microscópico, las cuales se recepcionaron de dos formas :

- a) En frascos de boca ancha con tapa rosca y además rotulada con los datos del paciente.
- b) Las muestras para cultivo de heces (coprocultivo), se obtuvieron a través del hisopado rectal, el hisopo luego fue colocado en el medio de transporte de Cary-Blair y mantenida a temperatura ambiente, procesándose inmediatamente dichas muestras, estas provenían de la URO (Unidad de Rehidratación Oral) y de Emergencias.

En el cultivo de heces se realizó la búsqueda de los siguientes enteropatógenos: especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Vibrios*, *Plesiomonas shigelloides*, con énfasis en la búsqueda de cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

El primer día se realizó **el examen macroscópico** para determinar el aspecto y consistencia de las heces, la presencia de moco y/o sangre y **el examen microscópico** que es un examen directo con azul de metileno para la observación de leucocitos fecales (reacción Inflamatoria) y hematíes. Se consideró reacción inflamatoria positiva al leer al microscopio: mayor de 20 leucocitos por campo.

Posteriormente se continuó con el protocolo de cultivo de heces establecido en el laboratorio de Microbiología del Hospital San Bartolome, según el flujograma del **cuadro No 4** en anexos.

1. Aislamiento Primario:

Primer día:

- ✓ Los hisopados rectales se sembraron en medios Selectivos: agar XLD, agar TCBS, agar Sangre con ampicilina (ASA), Agar Bolton un medio libre de sangre para *Campylobacter* y agar Mc Conkey para la búsqueda de EPEC, luego fue incubado a 37 °C por 18 a 24 horas. La siembra se efectúa por dispersión y agotamiento.
- ✓ También se realizó la siembra en Caldos de enriquecimiento: caldo Selenito. Agua peptonada alcalina.

Segundo día:

- ✓ La lectura en los medios de aislamiento primarios selectivos; fueron para seleccionar colonias sospechosas de enteropatógenos:
 - En el agar XLD colonias rojas con o sin punto negro para la búsqueda de *Salmonella* y *Shigella*
 - En el agar TCBS, colonias amarillas y/o verdes grandes para la búsqueda de especies de *Vibrios*.
 - En el agar Sangre con ampicilina, colonias β -hemolíticas para la búsqueda de *Aeromonas* y colonias no hemolíticas para la búsqueda de *Plesiomonas shigelloides*.
 - En el agar Bolton, colonias grisáceas pequeñas ligeramente opacas para la búsqueda de especies de *Campylobacter*.
 - Y en el agar Mac Conkey colonias rojas (lactosa positivas) e incoloras (lactosa negativas) para la búsqueda de EPEC.
- ✓ Repicamos 5 a 10 colonias lactosa positiva de *E.coli* y también colonias lactosa negativas en el caso de ser aisladas en el agar Mac Conkey.

- ✓ La resiembra de los caldos de enriquecimiento se realizo sobre el agar SS y TCBS, colocando una asada de los caldos de enriquecimiento sobre los medios antes mencionados.
- ✓ Las colonias sospechosas de enteropatógenas se sembraron en medios diferenciales de TSI y LIA (Como prueba de Screening según Grados, del Manual para aislamientos de *Shigella* y *Salmonella*).

Tercer día:

- ✓ Lectura e Interpretación del TSI y LIA.
- ✓ Lecturas del agar SS y TCBS.
- ✓ Siembra en medios de diferenciación bioquímica (citrato, TSI, LIA, MIO, urea, Voges-Proskauer, Gelatina) como pruebas de Confirmación para *Escherichia coli*.
- ✓ Susceptibilidad antimicrobiana

Cuarto día:

- ✓ Lectura de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos .(Ver en anexos).
- ✓ Lectura de los medios diferenciales . Ver en anexos **Fig. No 1.**
- ✓ Pruebas Serológicas:

2. Pruebas serológicas

La presencia de EPEC se determina, inicialmente, mediante pruebas serológicas con antígenos somáticos (O), por la exposición a los sueros inmunes anti-*E. coli* nonavalente (polivalente A, B y C). Ver en anexos **Fig. No 2.**

En las colonias de *Escherichia coli* lactosa positiva se realizo las pruebas serologicas para EPEC, que nos permitió diferenciar e identificar los serogrupos EPEC involucrados en casos de niños con diarrea. También se realizo la serologia en colonias de *E. coli* lactosa negativa porque se debe recordar que un serotipo de EPEC

el O124 es usualmente no fermentador de lactosa en la placa de aislamiento primario (Mc Conkey) (11)

Aglutinación en lámina de vidrio:

- ✓ Preparar la suspensión bacteriana homogénea, tomando una adecuada asada de TSI o TSA y disolverlo en una gota de solución salina – formolada (antígeno). *Si se observa autoaglutinación no proseguir con la prueba.*
- ✓ Colocar frente a la suspensión una gota de suero (0.02 mL) inmune nonavalente (polivalente anti-*E. coli*).
- ✓ Mezclar ambas gotas, moviendo la lámina en vaivén aproximadamente por 15 veces para una mezcla óptima y realizar lectura.
- ✓ Si se aprecia la reacción de la aglutinación se considera positivo, y queda determinado el grupo. Ver en anexos en el **cuadro No 4**.
- ✓ Si la muestra no aglutinara, con el suero nonavalente (polivalente), no estaríamos frente a *E. coli* EPEC.
- ✓ **Aglutinación de acuerdo al antígeno somático (O):**

Una vez determinado el grupo se realizan otras pruebas serológicas por aglutinación en lámina de vidrio (de acuerdo al procedimiento anterior) para determinar los serotipos específicos probándolos con cada uno de los antígenos somáticos de cada mixtura:

Mixtura I: O111, O55, O26

Mixtura II: O86, O119, O127

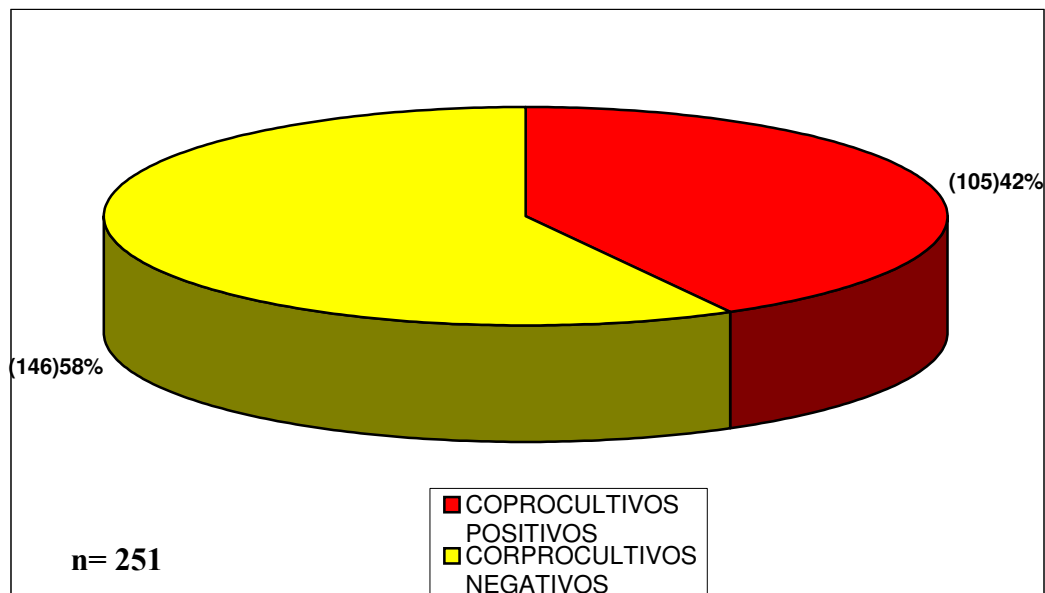
Todas las cepas aisladas en los procedimientos bacteriológicos para identificar a la bacteria y su serología fueron confirmadas por el Centro de Investigación de la Marina de los EEUU (NAMRID), en el Hospital Naval, los cuales corroboraron los

resultados de este trabajo.

3. Análisis estadístico de los datos: Los datos se procesaran con la formula de Test de Fisher. Y se analizará, con el programa Epi-Info.

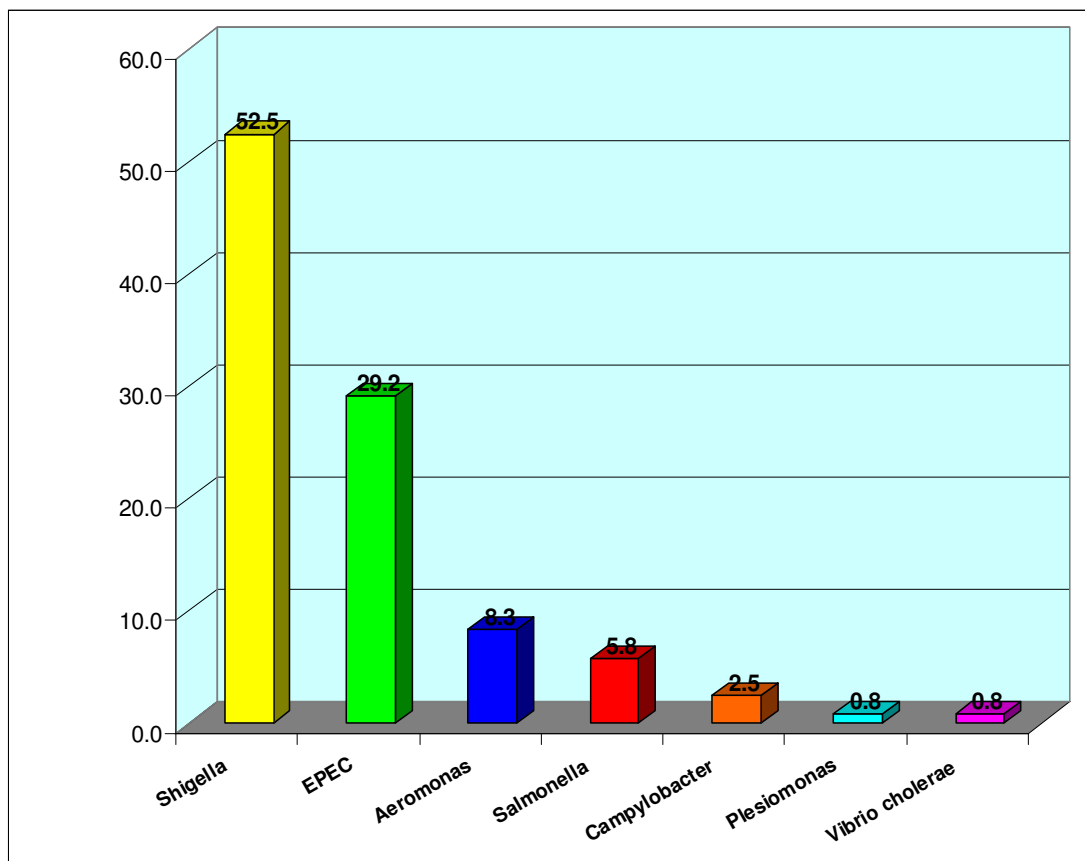
IV. RESULTADOS

GRAFICO N° 1: Coprocultivos positivos a enteropatógenos en cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



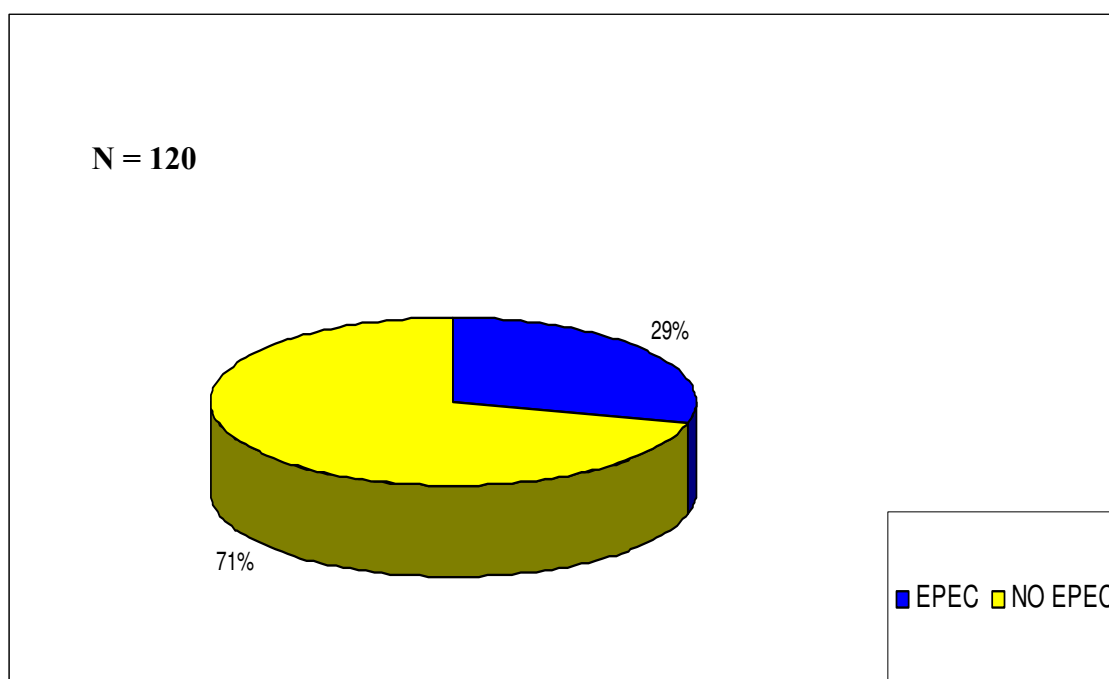
Del total de muestras procesadas (251) en este estudio se halló que 105 (42%) correspondían a cultivos positivos para enteropatógenos y 146 (58%) eran cultivos negativos.

GRAFICO N° 2: Enteropatógenos aislados en cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



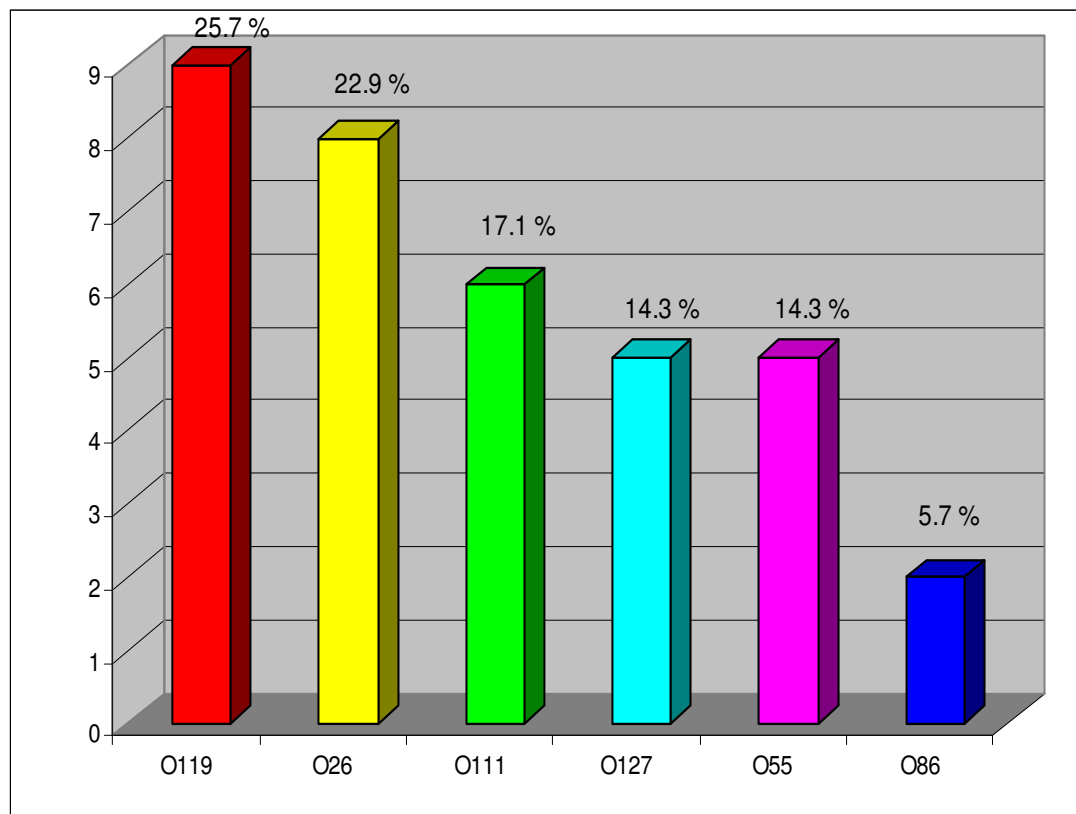
Del total de muestras positivas en este estudio se halló 120 bacterias enteropatógenas de importancia clínica en el siguiente orden de frecuencia: *Shigella* spp. 63 (52,5%), EPEC 35 (29,2%), *Aeromonas* spp. 10 (8,3%), *Salmonella* spp 7 (5.8%), *Campylobacter* 3 (2.5%), *Vibrios* 1 (0.8%) y *Plesiomonas* 1 (0.8%).

GRAFICO N° 3: EPEC positivos aislados del total de enteropatógenos en cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



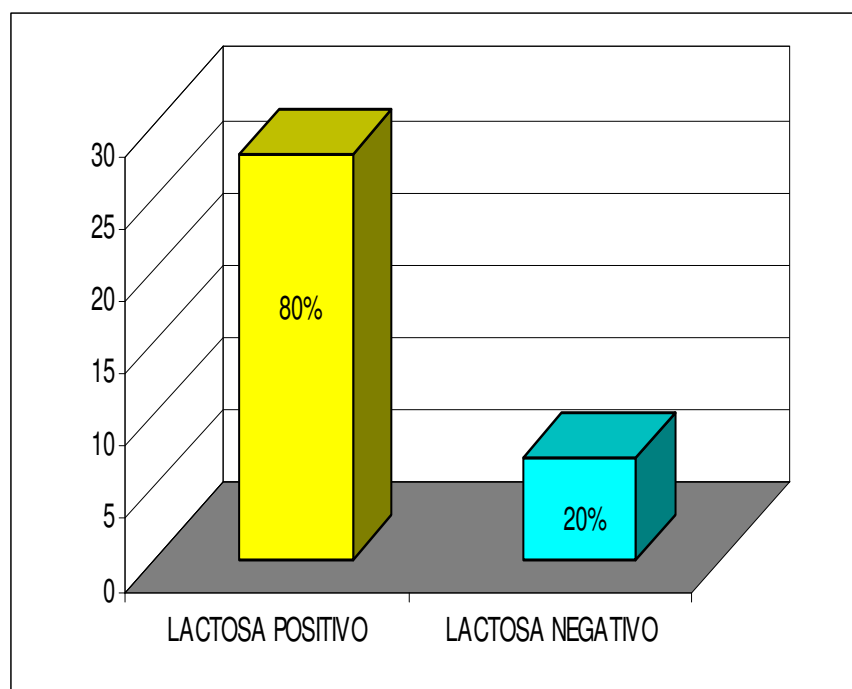
Del total de muestras procesadas positivas a enteropatógenos en este estudio se halló que 35 (29,2%) eran EPEC.

GRAFICO N° 4: Distribución de los serotipos hallados en cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



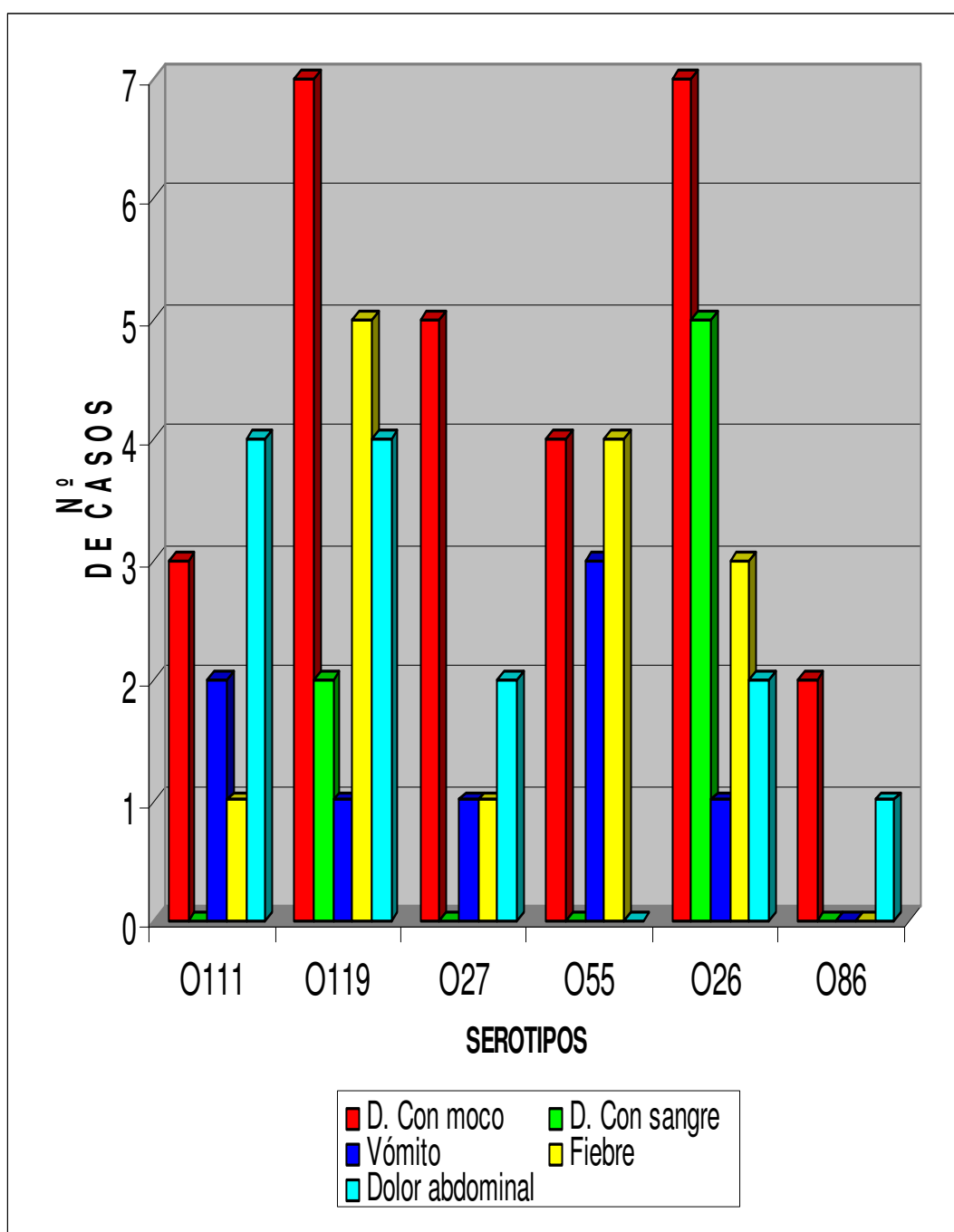
De los 35 aislamientos de EPEC se encontró que 9 (25.7%) correspondían al serotipo O119; 8 (22.9%) del serotipo O26; 6 (17.1%) del serotipo O111; de los serotipos O127 y O55 se encontró 5 (14.3%), finalmente del O86 se encontró que correspondía al 2 (5.7%),

GRAFICO N° 5: Aislamiento de EPEC fermentadoras de lactosa hallados en cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



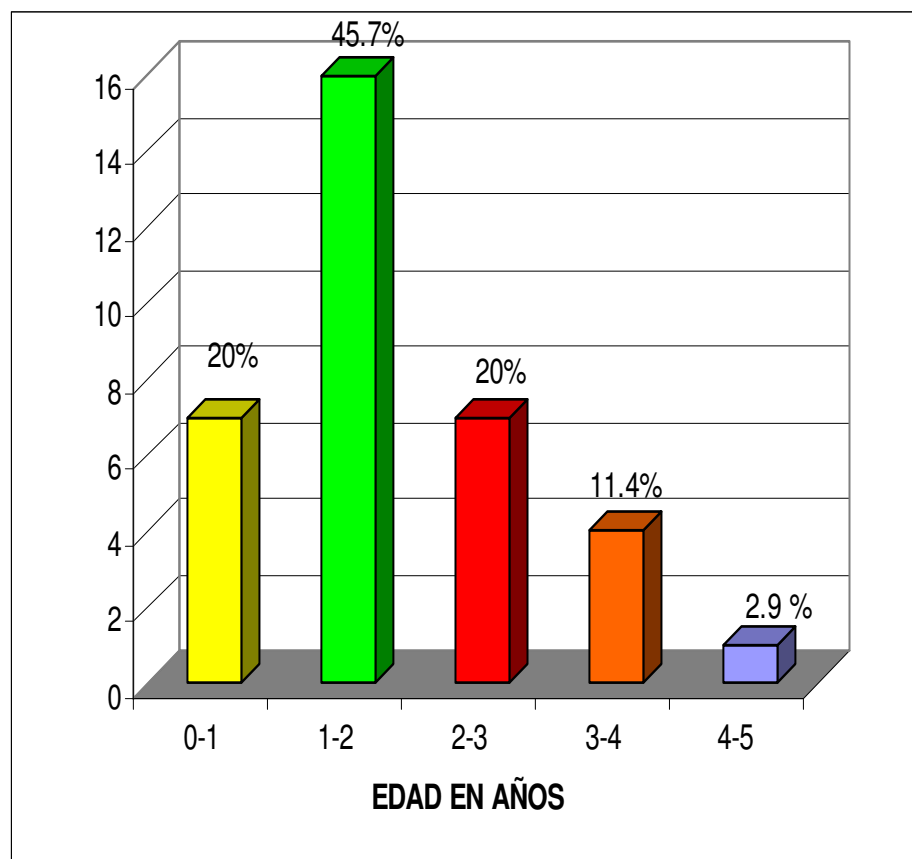
Cabe mencionar que 28 (80%) de las muestras EPEC aisladas tenían como característica bioquímica ser fermentadoras de lactosa: L (+).

GRAFICO N° 6: Distribución de la sintomatología en serotipos de EPEC hallados en cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



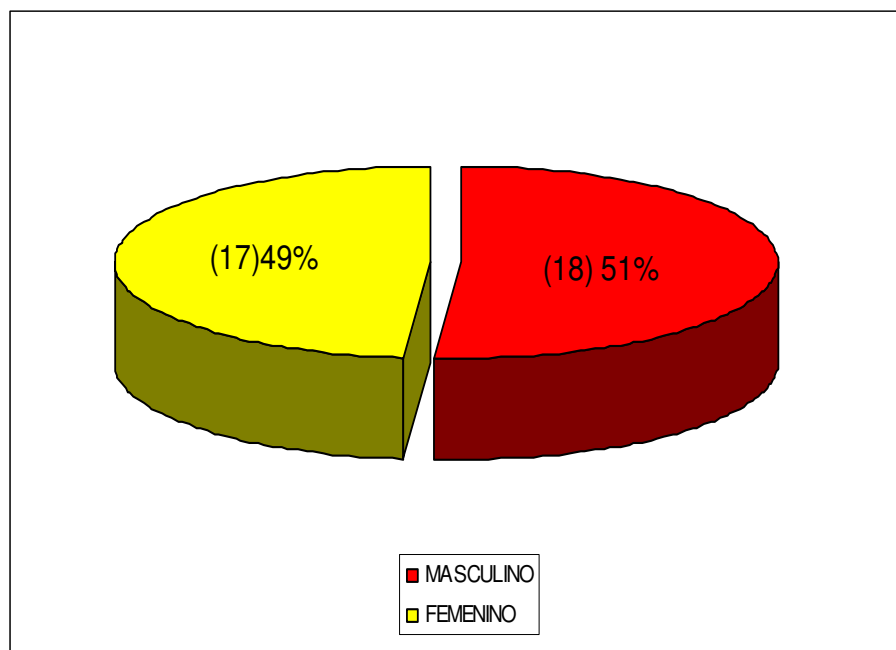
Por otro lado, con relación a las manifestaciones clínicas correspondientes al serotipo O119, se encontró que de cada nueve casos 7(77.78%) presentaron diarrea con moco; 2(22,2%) diarrea con sangre; 5(55.56%) fiebre y 1(11.11%) vómito. Para el serotipo O111 se encontró seis casos de los cuales 3(50%) tenían cuadros diarreicos asociados con moco; 4(66,6%) con dolor abdominal y 1(16.67%) con fiebre. Se encontraron ocho casos del serotipo O26; de éstos 7(87,5%) fueron positivos a diarrea con moco; 5(62.50%) positivos a diarrea con sangre; 3(37.5%) a fiebre y 1(12.5%) vómito. En cuanto a las manifestaciones clínicas para el serotipo O55, de cinco casos de diarrea aguda 4(80%) presentaron moco; 3(60%) vómito y 4(80%) fiebre. Para el serotipo O127 se encontró que 5(100%) fueron positivos a diarrea con moco; 2(40%) diarrea con dolor abdominal y 1(20%) vómito con fiebre. En este estudio se determinó que para el serotipo O86 de dos casos (100%) fueron positivos a diarrea con moco y 1(50%) diarrea con dolor abdominal .Ver en anexos **cuadro No 2**.

GRAFICO N° 7: Distribución de EPEC en los cuadros diarreicos agudos por edades en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



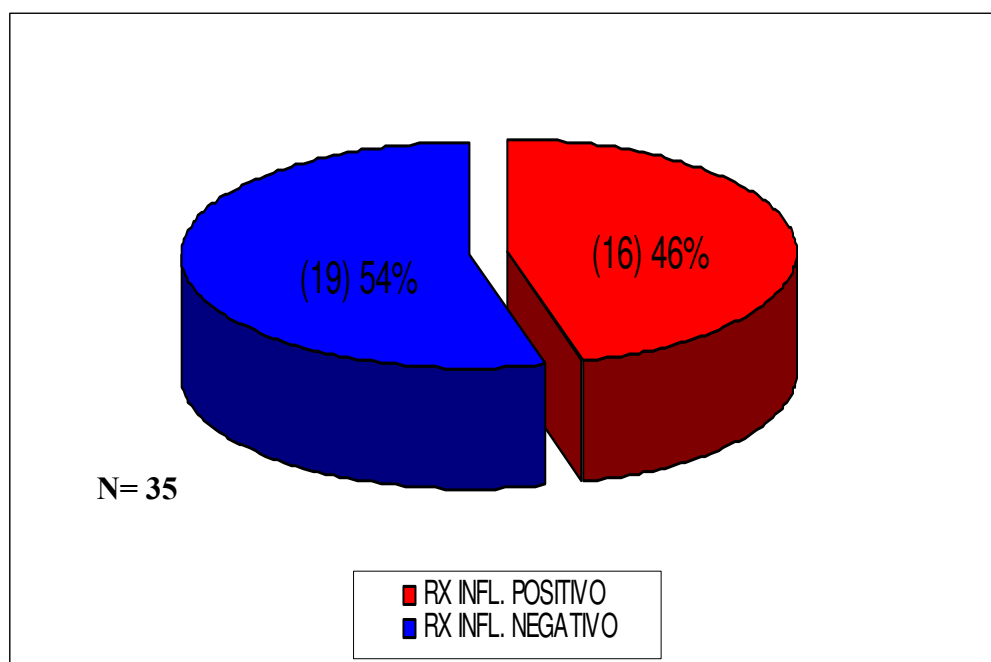
Por otro lado, en cuanto a la distribución por edades el mayor grupo correspondió a niños entre 1 – 2 años con 16 (45.7%) casos; siendo la menor presentación del cuadro diarreico en niños mayores de 3 años.

GRAFICO N° 8: Distribución de EPEC según el sexo en cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



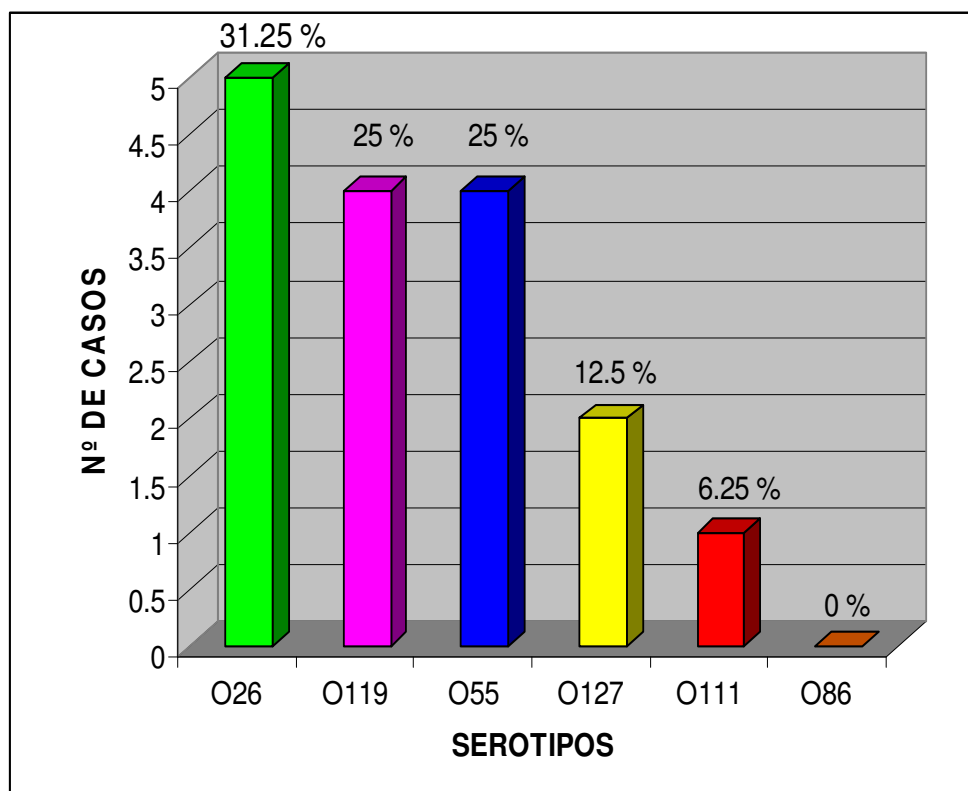
En cuanto a la distribución por sexo, se encontraron, resultados similares tanto en niños y niñas, 18(51%) y 17(49%) respectivamente.

GRAFICO N° 9: Reacción inflamatoria en EPEC causante de cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



De 35 casos de EPEC, se halló 16 (46%) casos positivos a reacción inflamatoria y 19 (54%) casos negativos.

GRAFICO N° 10: Reacción inflamatoria por serotipos de EPEC causantes de cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.



En relación a la reacción inflamatoria positiva por serotipo de EPEC se halló que de 16 casos aislados, 5 (31.25%) corresponden al serotipo O26; 4 (25%) al serotipo O119 y O55 respectivamente; 2 (12.5%) para el serotipo O 127; 1 (6.25%) para el serotipo O111 y 0% para el serotipo O86. Ver en anexos la **Tabla No 1** .

V. DISCUSION

Las infecciones entéricas son las enfermedades más comunes en el ser humano. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que alrededor de 2 millones de niños mueren al año de enfermedades diarreicas en países en vía de desarrollo y producen además la muerte de un niño cada 15 segundos alrededor del mundo (42). Entre los agentes etiológicos clásicos que producen un cuadro diarreico importante en los niños se encuentra la *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (18,42).

En el presente estudio, del total de muestras procesadas se identificó 105 (42%) coprocultivos positivos a bacterias enteropatógenas causantes de diarrea aguda y 146 (58%) coprocultivos negativos. Este valor alto de positividad a bacteria enteropatógenas se debió probablemente a la implementación de la búsqueda de EPEC durante el periodo de estudio, ya que el promedio de la positividad de los coprocultivos en el laboratorio de microbiología del Hospital San Bartolome fue de aproximadamente un 20 - 30 % en años anteriores.

Otro hallazgo importante fue la presencia de EPEC como agente etiológico de diarrea, ocupando el segundo lugar después de *Shigella sp*, durante el periodo de estudio. En el Perú, no existen estudios de serotipificación en relación a EPEC. Sin embargo en otros países latinoamericanos existen trabajos sobre EPEC, como en Brasil (1993 – 1994) donde reportan a EPEC en segundo lugar el cual concuerda con nuestro estudio (21). Contrariamente a nuestros resultados en Argentina (1986 –

1996) reportaron a EPEC en tercer lugar (50).

La falta de información sobre la positividad de EPEC en los coprocultivos en el país se debe a que en nuestro medio, la serología a EPEC no es un procedimiento rutinario para la identificación de los serotipos de EPEC debido a que la mayoría de laboratorios de nuestro país realiza el cultivo de heces (coprocultivos) orientados principalmente a la identificación de especies de *Shigella* y *Salmonella*. (1, 3, 4, 5, 8, 11, 12,)

También se demostró en nuestro estudio que la frecuencia de los aislamientos de EPEC fue 29,2 % de 120 enteropatógenos aislados en 105 coprocultivos positivos, contrario a nuestro hallazgo, en otro trabajo de tesis realizado en Perú por Nieves y col. (40) en el año 2000 se encontró que 7.39 % de casos son EPEC respecto al total de coprocultivos procesados, esta diferencia puede deberse a que este ultimo estudio estuvo orientado específicamente a la identificación y aislamiento de especies de *Campylobacter*. En otros estudios realizados en Latinoamérica como en Brasil, en los años 1993 - 1994, se identificó EPEC con una frecuencia de 13% (50) resultados contrarios a los del estudio; y en Argentina en los años 1986 – 1996, EPEC tuvo una frecuencia de 23,3% (21), resultados que fueron similares al nuestro.

Por otro lado, en un estudio realizado por Tardelli y cols (51) en Brasil en donde los investigadores emplearon 12 antisueros para la identificación de serotipos de EPEC , encontraron la presencia de EPEC con frecuencia de 28.4% en 500 casos de niños menores de un año; resultados similar al hallado en nuestro estudio donde encontramos una frecuencia de EPEC de 29,2%, a pesar de haber utilizado solamente 6 antisueros las mismas que en la literatura internacional representan los

serotipos más frecuentes de los aislamientos de EPEC (12, 19, 21, 22, 50).

Con respecto a los serotipos de EPEC hallados en este estudio los más frecuentes fueron O119 y O26, en el cual esperábamos encontrar con más frecuencia a los serotipos O119 y O111. El serotipo O111 fue encontrado en tercer lugar en nuestro estudio. Los porcentajes de los serotipos encontrados fueron 9 (26%) de O119, 8 (23%) de O26, 6 (17%) de O111, 5 (14%) de O127 y de O55 respectivamente, porcentajes diferentes fueron encontrados por otros autores como en el estudio realizado por Toporovsky y col. (50) en Brasil en el año 1999 quienes reportaron los serotipos O111 y O119 en un 12.5% y 5% respectivamente. Mientras que en Chile en un estudio realizado por Prado V. y col (22) durante los años 1982 – 1983 reportaron los serotipos O111, O119, O55 y O86 en un 31.9%, 23.4%, 21.7% y 10.6% respectivamente. La variabilidad encontrada en la frecuencia de los diferentes serotipos hallados en diferentes países puede ser explicada por la variabilidad geográfica y socio-cultural mencionada por algunos autores (48).

En nuestro estudio el porcentaje de serotipos no fermentadores de lactosa fue de 20 % y los serotipos involucrados fueron O119 con 37.5%, el O26 y O111 con 25% respectivamente, y el O55 con 12.5%. Se debe recordar que el serotipo de EPEC O124 es usualmente no fermentador de lactosa en la placa de aislamiento primario (11). Cabe mencionar que en el estudio no se utilizó antisueros para EPEC O124.

Con respecto a las características macroscópica y microscópica de la muestra de heces procesadas en nuestro estudio, el 68.56% de las muestras de los coprocultivos positivos a EPEC presentaron moco y 20% presentaron sangre. Debemos resaltar que la diarrea por EPEC es caracterizado por gran cantidad de moco pero sin sangre

visible en la heces (32).

En cuanto a los resultados de reacción inflamatoria por cada serotipo de EPEC se observó un importante porcentaje en relación a algunos serotipos. Principalmente el serotipo con mayor positividad a la presencia de leucocitos en heces fue el O26 con 5 (31,25%) casos y el serotipo O86 no presento leucocitos. No existe referencia bibliográfica sobre alguna relación entre leucocitos fecales y el serotipo de EPEC causante de diarrea aguda.

En el presente trabajo, no se encontró diferencia significativa entre los pacientes pediátricos del sexo masculino 18(51%) y femenino 17(49%), resultados similares fueron encontrados por Manrique y col., que tampoco reporta diferencia significativa referente al sexo (41).

En nuestro estudio, EPEC fue aislado con mayor frecuencia en niños entre 1 a 2 años con 45.71% (16/35), y se encontraron menos casos a medida que disminuía o aumentaba la edad. Según Fred Manrique y cols (41) , la menor frecuencia de EPEC en los niños mayores de 2 años podría estar explicado por el grado de inmunidad que se van adquiriendo a lo largo de la vida del huésped, probablemente por exposición repetida a antígenos de *Escherichia coli* como parte de la flora normal intestinal . .

Nuestros resultados con respecto a las edades muestran una diferencia significativa con los obtenidos por Tardelli y cols (51), quienes encontraron una incidencia de 40% en niños de 0 – 2 meses y 12% en niños de 9 – 11 meses. Recientemente Fred Manrique y col (41) en el 2004, reportaron un 38% en niños de 0 – 6 meses y 15.5% en niños mayores de 3 años. Debido a nuestros resultados y de otros investigadores

debemos tener en cuenta los protocolos de investigación de EPEC en muestras fecales en donde se recomiendan la búsqueda de esta bacteria en niños menores de 2 años (10), principalmente en brotes comunitarios o nosocomiales.

Tanto en los países desarrollados como en los países en vía de desarrollo, la importancia etiológica del aislamiento de EPEC en casos esporádicos de enteritis infantil es una cuestión poco clara y controversial, y ha planteado interrogantes acerca del valor de la serotipificación rutinaria de EPEC en casos esporádicos de diarrea (11). Mientras las investigaciones continúen con respecto a este tema, cada país debe decidir acerca del valor de la serotipificación teniendo en cuenta la disponibilidad, la calidad y el costo de los antisueros.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Los serotipos más frecuentes de EPEC en los cuadros diarreicos agudos de niños menores de cinco años fueron los serotipos O119 y O26.
- ✓ La frecuencia de EPEC en los cuadros diarreicos agudos en niños menores de cinco años fue de 29,2 % (35 casos) ocupando el segundo lugar después de *Shigella sp.*
- ✓ *E. coli* enteropatógena fue lactosa positivo en el 80% (28 casos) estudiados.
- ✓ El serotipo O26 de EPEC presentó manifestaciones clínicas de cuadros diarreicos asociados a moco y sangre.
- ✓ EPEC fue más frecuente en los niños de 1 – 2 años con 45.7 % (16 casos).

VII. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere la búsqueda de EPEC en niños menores de 2 años como agente etiológico de diarreas.
2. Se recomienda la implementación de técnicas serológicas para la serotipificación de los aislamientos de EPEC.
3. Se recomienda seleccionar colonias fermentadores de lactosa y colonias no fermentadoras de lactosa en el agar Mc Conkey, para mejorar la recuperación de cepas de EPEC en cuadros diarreicos agudos.
4. Recomendamos la búsqueda de los serotipos de acuerdo a la frecuencia en cada región.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. NELSON, L. Tratado de Pediatría. Vol II, 15ª ed. México. Ed. Mc Graw – Hill – Interamericana. pp 903 – 907 y 995 – 997, 1997.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. A manual for the treatment of acute diarrhea for use by physicians and other senior health workers. Geneva: Program for Control of Diarrhoeal Diseases, World Health Organization. WHO/CDD/SER/ 80.2 Rev. 2, 1990.
3. FARRERAS, R. Medicina Interna. Vol I, 13ª ed. España. Mosby/Doyma . pp 157 – 159 y 192 – 195, 1995.
4. CECIL, A. Tratado de Medicina Interna. Vol II, 19ª ed. Filadelfia – Pensilvania USA. Ed . Interamericana. pp 1965 – 1966, 1992.
5. HARRISON, L. Principios de Medicina Interna. Vol II, 14ª ed. España – Madrid. Mc Graw – Hill – Interamericana. pp 909 – 911 y 1070 – 1072, 1998.
6. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. División de Bacteriología . Manual de “*E. coli* Diarreogénica y Diagnóstico por *E. coli* O157:H7”. Lima- Perú . 8 al 12 de marzo de 1999.

7. RINCON, G. y cols. Frecuencia de Bacterias Enteropatógenas en Niños Menores de Cinco Años. Venezuela, Maracaibo. Kasmera 30 (1): 33-41, Jun. 2002.
8. FERNANDEZ, R. y cols. *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. Revista Cubana Pediátrica. Vol. 75(3):0 – 0. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script>. Julio- septiembre 2003.
9. SUSSMAN, M. The Virulence of *Escherichia coli*. The Society for General Microbiology. Centro de Investigaciones del Department of Microbiology, Medical School, University of Newcastle Upon Tyne, UK. pp 1-4, 1985.
10. KELLEY, L. Medicina Interna. Vol. II, 14ª ed. USA. Ed. Médica Panamericana. pp 1656 – 1659, 1991.
11. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Diarrea debida a *Escherichia coli*. Informe de un subgrupo del grupo de trabajo científico sobre Epidemiología y Etiología. Copenhague 15 y 16 de enero de 1979.
12. ARIAS, B. y cols. *Escherichia coli* enteroagregativa en niños con diarrea de un hospital de Lima. Revista Peruana de Medicina Experimental y salud pública. Vol. 21(3): 176 – 178, Jul–Set.2004.
13. HUAPAYA, B. y cols. Primer aislamiento de *Escherichia coli* 0157: H7 enterohemorrágica en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y

Salud Pública. Vol. 18 (1-2): 38 – 39, 2001.

14. MAGALHAES, M. y cols. Localized, difusse and Aggregative – Adhering *Escherichia coli* from infants with acute diarrhea and matched – controls. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 87 (1): 93 – 97, Marzo 1992.
15. GIRON, J. y cols. Distribution Of The Bundle-Forming Pilus Structural Gene (bfpA) among Enteropathogenic *Escherichia coli*. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 168:1037 – 41, 1993.
16. GOMEZ, T. y cols. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to Hela cells in infants with diarrhea and matched controls. Journal of clinical Microbiology. Vol. 27(2), pp 266 – 69, 1989.
17. MARTINEZ, Y. Red Global de Regulación Transcripcional de la Patogenicidad de *Escherichia coli* Diarreogénica. UNIVERSITY OF TEXAS MEDICAL BRANCH AT GALVESTON. Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas. 2003.
18. RODRIGUEZ, G, y cols. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública de México. Vol. 44 (5):464-475, Septiembre-Octubre del 2002.
19. NATARO, J. y cols. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology

Reviews. Vol. 11 (1):142-201, Jan. 1998.

20. SEARS, C. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and Linkage to Intestinal secretion. Microbiology Review. Vol. 60 (1):167-215, 1996.
21. QUIROGA, M. y cols. Asymptomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Misiones, Argentina, during the first twenty months of their lives. Revista do Instituto do Medicina Tropical do Sao Paulo. Vol. 42(1): 9 – 15, 2000.
22. PRADO, J. y cols. *Escherichia coli* Enterotoxigena y *Campylobacter jejuni* en el Síndrome Diarreico Agudo en Lactantes Chilenos. Boletín Of Sanit. Panam. Vol. 104(1): 51 – 61, 1988.
23. SCOTLAND, S. y cols. Laboratory test for enterotoxin production, enteroinvasion and adhesion in diarrheagenic *Escherichia coli*. The Society for General Microbiology. pp 395 – 405, 1985.
24. BRUSSOW, H. y cols. Epidemiological Analysis of Serologically Determined Rotavirus and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections and Ecuadorian Children. Journal of clinical Microbiology. Vol. 30(6):1585-1587, June 1992.
25. CHINEN, I. y cols, “Diagnóstico de *Escherichia coli* enteroinvasiva asociada a diarrea”. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 25:27-35, 1993.

26. GERMANY, Y. y cols. Prevalence of Enteropathogenic, Enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in New Caledonia. *The Journal of Infectious Diseases*; 174:1124 –26, 1996.
27. CRUZ, J. y cols. Etiología de diarrea en infantes de áreas marginadas en Guatemala. INSTITUTO DE NUTRICIÓN DE CENTROAMÉRICA Y PANAMÁ – INCAP. pp 42-54, del 24 de noviembre de 1948.
28. DANIKA, L. y cols. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: Masters of Host Cell Cytoskeletal Exploration. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 5(2).pp 1 – 10, 1999.
29. FARRERAS, R. Medicina Interna. Vol. II, 13ª ed. España. Mosby/Doyma . pp 2276 - 2278, 1995.
30. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Diagnóstico de Laboratorio para EDAS y Cólera. Curso teórico- práctico. Regiones de Arequipa, Moquegua y Tacna. Lima-Perú 1998.
31. MARGALL, N. y cols. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública*. pp.437-443, 1997.
32. MYRON, M. y cols. *Escherichia coli* that cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteradherent. *The Journal Infectious Diseases*. Vol. 155(9):377-389, 1987.

33. CRAVIOTO, A. y cols. Infecciones por *Escherichia coli* enteropatógena. Gaceta Médica de México. Vol. 132(6) pág 611 – 615, 1993.
34. HAMOND, A. A Preliminary Investigation on the Chemical Composition of The Cell Surface of Five Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 94(4): 513 – 518, 1999.
35. FAGUNDES – NETO, U. y cols. Ultrastructural study of Enteropathogenic *Escherichia coli* 0111 ab: H2 Infection in an infant with acute diarrhea. Arq. Gastroenterología Pediátrica. Vol. 32(3):152-156, Jul-Set 1995.
36. AZIZEDITE, G. y cols. Virulence Properties and Clonal Structural of Strains of *Escherichia coli* 0119 Serotypes. Infection and Immunity. Vol. 65(6): 2034 – 2040, 1997.
37. HARRISON, L. Principios de Medicina Interna. Vol I, 14ª ed. España – Madrid. Mc Graw – Hill - Interamericana. pp 270 – 276, 1998.
38. CECIL, A. Tratado de Medicina Interna. Vol. II, 19ª ed. Filadelfia – Pensilvania USA. Ed. Interamericana. pp 1980 – 1984, 1992.
39. ARIAS, H. y cols. Detección molecular de toxinas termoestable y termolábil de *Escherichia coli* mediante hibridación. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. Vol. 19(4): 193 – 196, 2002.

40. NIEVES, F. y col. Tesis sobre Incidencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en niños menores de 5 años con cuadro diarreico agudo. Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé. Enero –Marzo 2000.
41. FRED, G. y cols . Agentes Causantes de Diarrea en Niños Menores de 5 Años en Tunja. Rev. Salud pública. Colombia. Vol. 8 (1): 88 – 97, abril 2006.
42. VIDAL, G. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): una causa frecuente de diarrea infantil. SALUD EN TABASCO. Vol. 9 (1):188-193, Abril 2003.
43. KNUTION, S. y cols. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and culture human intestinal mucosa. Infection and Immunity. Vol 48(3):1230-44, 1985.
44. ECHEVARRIA, P. y cols. Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. The Journal Infection of Diseases. Vol. 165:141 – 43, 1992.
45. GOMEZ, T. y cols. Adherence Patterns and Adherence-Related DNA Sequences in *Escherichia coli* Isolates From Children With And Without Diarrhea in Sao Paulo City, Brazil. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 36(12): 3609 – 3613, Dec 1998.
46. MOON, H. y cols. Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in Pig and Rabbit Intestines. Infection and

Immunity. Vol. 41(3): 1340 – 1351, 1983.

47. SANCHEZ, S. y cols. Caracterización Geno-Fenotípica de Aislados de *Escherichia coli* AEEC de Pacientes Pediátricos con Procesos Diarreicos Infecciosos en la Ciudad de la Paz: Implicancias Para el Diagnóstico y Epidemiología de las Enfermedades Diarreicas. Rev. Soc. Bol. Ped. Vol. 43(3): 132-43, 2004.
48. GIAMMANCO, A. y cols. Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E.coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. Journal clinical of Microbiology. Vol 34 : 689-94, 1996.
49. HUGUET, J. *Escherichia coli*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. Vol. 19(004): 219, 2002.
50. TOPOROVSKI, M. y cols. Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada a de grupo controle. Journal de Pediatria. Vol.75 (2):97-104, 1999.
51. TARDELLI, T. y cols. Serotype- Specific Prevalence of *Escherichia coli* Strain with EPEC Adherent Factor Genes in Infants with and without Diarrhea in São Paulo, Brasil. The Journal of Infectious Diseases. Vol.60 (1).July 1989.

IX. ANEXOS

FICHA CLINICO EPIDEMIOLOGICA

Codigo:

I. DATOS DEL PACIENTE:

a. Apellidos y Nombres:

Edad:

Sexo:

Dirección:

b. Características Clínicas: (Síntomas y/o signos):

Presencia de vómito ()

Fiebre ()

Diarrea ()

Dolor abdominal ()

Diarrea con moco ()

Diarrea con moco y sangre ()

Frecuencia de las heces: 2 veces al día ()

3 a 5 veces al día () Otros:

Fecha:

FICHA MICROBIOLÓGICA

Código:

1. Apellidos y Nombres del paciente:**2. Características macroscópicas de las heces:**

Consistencia: Color:

Presencia de moco: Olor:

Presencia de sangre:

3. Examen microscópico:

Reacción inflamatoria:

Coloración GRAM:

4. Coprocultivo: Negativo () Positivo () EPEC() **Shigella**.....() **Salmonella**.....() **Campylobacter**....() **Otros****5. Pruebas confirmatorias:**

Fermentación de lactosa:.....

Producción de gas:.....

Producción de hidrogeno sulfurado:.....

Lisina descarboxilasa:.....

Lisina desaminasa:.....

Producción de indol:.....

Ornitina descarboxilasa :.....

Movilidad:.....

Utilización de Citrato:.....

Producción de ureasa:.....

Producción de acetoina :.....

Producción de gelatinasa:.....

6. Pruebas serológicas para EPEC:

NONAV	MIX I	MIX II	SEROTIPO

7. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos:

S R I

Cefalotina

Ampicilina

Ciprofloxacina

Tetraciclina

Sulfametoxazol-trimetoprim

Cloramfenicol

Furazolidona

Gentamicina

Amikacina

Amoxicilina / clavulanico

Ceftazidima

Aztreonam

Fecha:

CUADRO N° 1: Serotipos implicados con cuadros de diarrea. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001

O18	O55H7	O119H6	O127H21
O26H.	O86H.	O125acH21	O128abH2
O26H11	O86H34	O126H.	O128H12
O55H.	O111H.	O126H2	O142H6
O55H6	O111abH2	O126H27	O158H23

CUADRO N° 2 Sintomatología de los casos de EPEC de acuerdo a cada serotipo. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001

Sintomatología	SEROTIPOS					
	O119 (9)		O26 (8)		O111 (6)	
	POS	%	POS	%	POS	%
D. Con moco	7	77.8	7	87.5	3	50.0
D. Con sangre	2	22.2	5	62.5	0	0.0
Vómito	1	11.1	1	12.5	2	33.3
Fiebre	5	55.6	3	37.5	1	16.7
Dolor abdominal	4	44.4	2	25.0	4	66.7

() numero de cepas aisladas por serotipo

Sintomatología	SEROTIPOS					
	O127 (5)		O55 (5)		O86 (2)	
	POS	%	POS	%	POS	%
D. Con moco	5	100.0	4	80.0	2	100.0
D. Con sangre	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Vómito	1	20.0	3	60.0	0	0.0

Fiebre	1	20.0	4	80.0	0	0.0
Dolor abdominal	2	40.0	0	0.0	1	50.0

() numero de cepas aisladas por serotipo

Tabla N° 1: Reacción inflamatoria de los casos de EPEC con respecto a cada serotipo. HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.

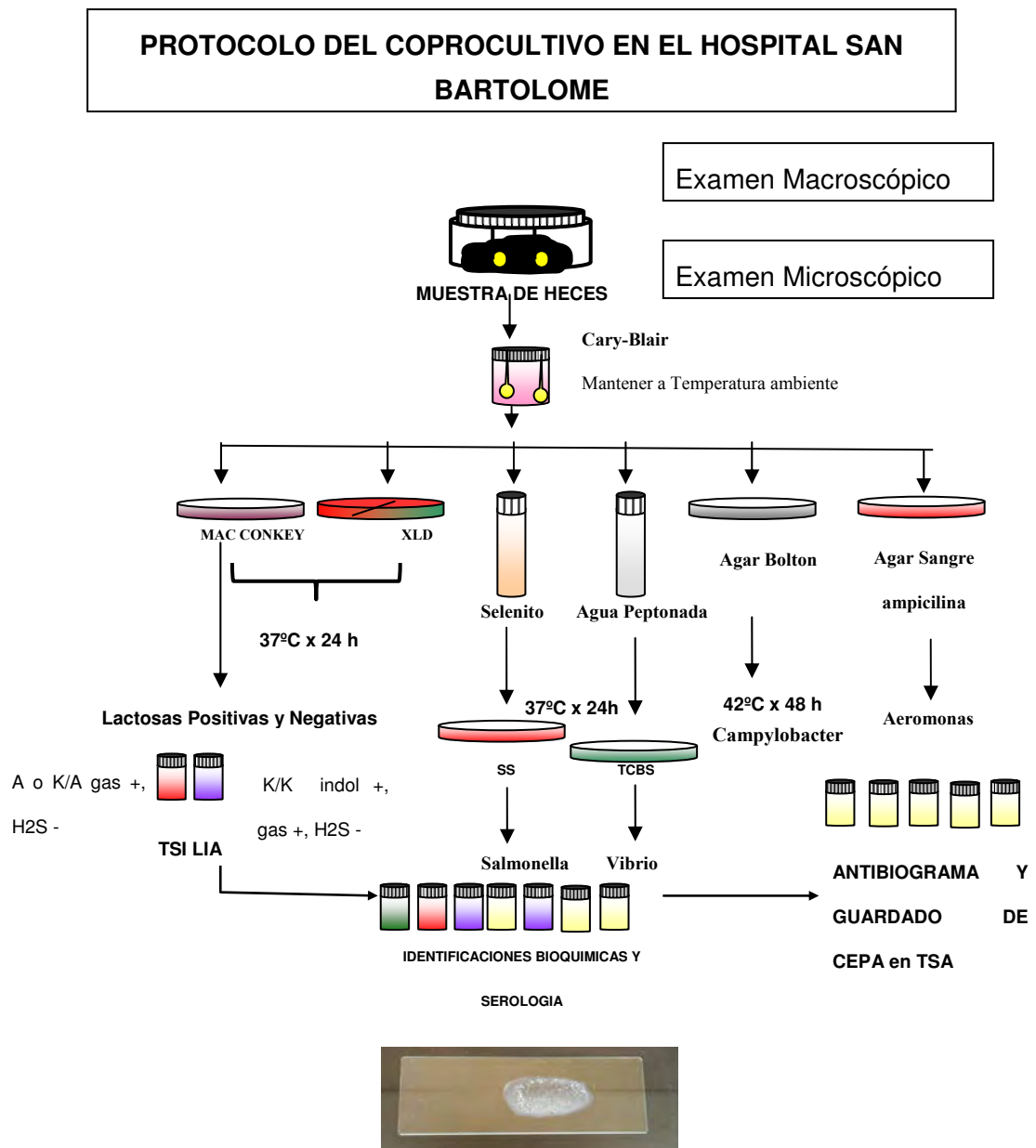
SEROTIPO	R. INFLAMATORIA		POSITIVO
	positivo	negativo	(%)
O111	1	5	16,67
O119	4	5	44,44
O127	2	3	40,00
O55	4	1	80,00
O26	5	3	62,50
O86	0	2	0,00

CUADRO N° 3: Susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de EPEC.

HONADOMANI “San Bartolomé”. Noviembre 2000 – Marzo 2001.

ANTIBIOGRAMA					
	S	I	R	R (%)	CEPAS PROBADAS
Cefalotina	17	9	8	23.5	34
Ampicilina	11	0	22	66.7	33
Ciprofloxacina	31	0	3	8.8	34
Tetraciclina	15	0	16	51.6	31
Sulfametoxazol/Trimetoprin	8	3	23	67.7	34
Cloramfenicol	26	1	7	20.6	34
Furazolidona	24	2	7	21.2	33
Gentamicina	24	2	5	16.1	31
Acido Nalidixico	32	1	2	5.9	34
Amikacina	23	2	6	19.4	31
Ceftazidima	27	1	3	9.7	31
Aztreonam	28	0	3	9.7	31

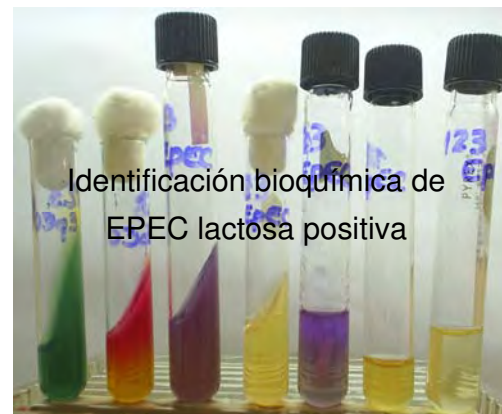
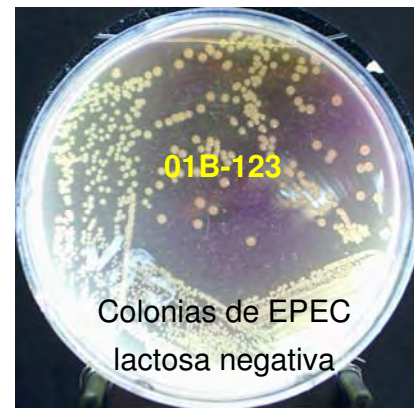
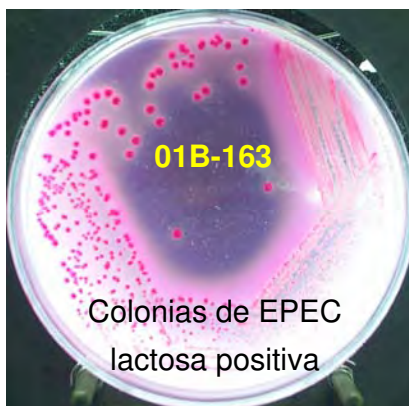
CUADRO No 4: Flujograma de trabajo del laboratorio de Microbiología en el HONADOMANI “ San Bartolome “.



FUENTE: Grados, INS. Manual de aislamiento de Salmonella y Shigella.

FIGURA No 1: Microfotografías tomadas de las cepas EPEC en el período de estudio en el HONADOMANI “San Bartolome”.Noviembre 2000-Marzo 2001.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE CEPAS DE EPEC



FUENTE: cepas aisladas en el periodo de estudio Noviembre 2000-Marzo 2001

FIGURA No 2: Kit reactivo de serología para la serotipificación de las *Escherichia coli* enteropatógena EPEC .

